

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

應用毛細管電動層析法(CEC)來測定人參藥品和靈芝中的有效成份

Determination of Ginsenosides and Ganoderic Acids from Ginseng Drug Preparations and Ganoderma Lucidum by Capillary Electrochromatography(CEC)

計畫編號：NSC 88-2113-M-032-002

執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31

主持人：薛文發 淡江大學化學系

一、中文摘要

本研究的目的是在探討使用毛細管電動層析法(Capillary electrochromatography, 簡稱 CEC)來分析人參, 人參藥品及靈芝中的有效成份。研究計劃包括萃取和分析二部份。第一, 使用 Sep-pak C₁₈ 固態萃取法做快速、有效的萃取人參, 人參藥品和靈芝的有效成份。第二, 人參藥品和靈芝的有效成份萃取液再使用近年來新發展的毛細管電動層析法(CEC)做分析, 本實驗也將同時比較毛細管電動層析法, 液體層析法(HPLC)和毛細電泳法(Capillary electrophoresis, 簡稱 CE)分析結果的不同。並探求 CEC 分析的 patterns, 來鑑定物種的不同。

關鍵詞：固態 Sep-pak C₁₈ 萃取法；毛細管電動層析法(CEC)；人參；人參藥品；靈芝

Abstract

The aims of this program is to determine the ginsenosides and ganoderic acids from Ginseng root, Ginseng drug preparations and Ganoderma lucidum by Capillary electrochromatography(CEC). The primary methods of the research program have two. First, the extraction of chemical compositions of strains of ginseng root, and Ganoderma lucidum by Sep-pak C₁₈ cartridges. Extraction of ginsenosides and

ganoderic acid using Sep-pak C₁₈ cartridges is a rapid and simple method. Second, the extracts were analyzed by capillary electrochromatography(CEC), from the CEC analysis, the composition pattern can be used to characterize the strains. In Capillary electrochromatography, the separation column is packed with a chromatographic packing which can retain solutes by the normal distribution equilibria upon which chromatography depends and is therefore an exceptional case of electrophoresis. In addition, the extracts were analyzed also by high performance liquid chromatography(HPLC) and capillary electrophoresis(CE), and we will compare the results.

Keywords: Sep-pak C₁₈ ; Capillary electrochromatography(CEC); Ginseng ; Ginseng drug preparations ; Ganoderma lucidum

二、緣由與目的

自古以來靈芝和人參在漢藥中佔有極重要的地位, 靈芝是一種稀世貴重的中藥。在我國最古老的藥學典籍「神農本草經」中, 記載著靈芝是一種「上藥」。所謂上藥, 就是指它與普通的藥不同, 它能每天服用而完全不產生副作用, 且長期服用後, 就可以調整身體的異變, 使體質正常化。在上藥之中, 能與靈芝並稱的, 就只屬人參一項了。靈芝和人參各種療效已

有很多書籍和論文討論過，在現代醫學上也給予人參極高的評價。至於靈芝的成份，包括有 mannitol, ergosterol, ganoderic acid A, B, C, D 和 ganoderic acids T-Z 等。從文獻上，已證明 ganoderic acid A, B, C, D 具有療效。而人參大部份的有效成份是在皂素成份(saponins)，皂素成份我們稱為 ginsenoside Rx，其中 X 表 0, b₁, b₂, b₃, c, d, e, f, g₁, g₂, g₃, h₁, h₂ 等 13 種。其中含量比較多的皂素分成有二類，第一類包含 Rb₁, Rb₂, Rc 和 Rd，它們具有 24(S)-protopanaxadiol 的結構，第二類包含 Re, Rf, Rg₁ 和 Rg₂，它們具有 20(S)-protopanaxatriol 的結構。有關於人參有效成份的液體層析法(HPLC)分離，1980 年代的論文已發表好幾篇，至於靈芝有效成份的 HPLC 的分離，在 1985 年日本 Kohda 等人也發表了一不錯的分離結果。在我們實驗室裡，從 1987-1991 也使用高效率薄層層析法(HPTLC)和液體層析法(HPLC)來分離韓國紅參，美國人參，GINSANA-G115 人參膠囊和日本及台灣產的靈芝。我們使用的 ODS-120T 分離管柱，分離效果雖然不錯，但不少的波峰分離並不理想，也沒有鑑定出來，近幾年來，毛細管電泳分離法(Capillary electrophoresis, 簡稱 CE)已開發成功，此種方法的基本原理，是帶電荷的物種在電場中，有不同的移動速率因而加以分離，此種分離方法的分離對象是要帶電荷的物種，至於中性物質則無法分離。1984 年，日本學者 Terabe 則提出改良式的 CE 方法，即膠束電動毛細管層析法(Micellar electrokinetic capillary chromatography, 簡稱 MEKC)，這種方法是加入界面活性劑(如 SDS)到溶液中，使界面活性劑的濃度達到膠束的形態(micelles form)而來分析中性的物質，最近毛細管電泳法又有新發展，即開發了毛細管電動層析法(Capillary electrochromatography, 簡稱 CEC)。毛細管電動層析法融合了毛細管電泳分離法(CE)和毛細層析法(Capillary chromatography)的優點。它是一種強而有力(powerful)的層析分離法，具有快速(high speed)，高效率(high efficiency)和高選擇性(high selectivity)的優點。CEC 的分離管柱

填充有 packing materials, 以一般的 distribution 平衡方式來滯留溶質，和 HPLC 比較，CEC 的分離效率高到 5-10 倍，而 HPLC 流動相的移動是靠幫泵的壓力，CEC 流動相的移動是靠電滲流(electroosmotic flow)。和 CE 比較，CEC 多了一個分配分離(distribution partition)的作用，因此具有較高的選擇性。CEC 可用來分析帶電荷和中性物質，本研究計畫將比較 CEC, HPLC 和 CE 的分析結果。並探求 CEC 分析的 patterns，來鑑定物種的不同。另一點，本研究對人參，人參藥品和靈芝的萃取，將採用固態萃取法，即使用 Sep-pak C₁₈ cartridge 作萃取。固態萃取法比傳統的有機溶劑萃取法來的快速簡單和有效率。

三、結果與討論

(一)使用 Sep-Pak C₁₈ 固態萃取法來萃取人參藥品和靈芝

1. GINSANA-G115 人參藥品

七個 G115 人參膠囊溶解於 100mL 的熱水中，加熱 30 分鐘，然後過濾之，取其中 30mL 萃取液以流速每分鐘 30mL 通過 Sep-pak C₁₈ cartridge(吸附作用)，然後再用 2mL 的甲醇以每分鐘 4mL 的流速沖提 Sep-pak C₁₈ cartridge，把人參 ginsenosides 的成份沖提出來，甲醇的萃取液置於冰箱(0-5°C)幾個小時，如果有沉澱物可用小型過濾器(filter)去除之，濾液可直接用於 HPLC, CE 和 CEC 的分析。

2. 靈芝實體部份

大約 1.5g 乾的靈芝實體(fruit bodies of *Ganoderma lucidum*)，經壓碎和 100mL 熱水萃取 30 分鐘後，過濾之。取其中 30mL 的萃取液，以流速每分鐘 30mL 通過 Sep-pak C₁₈ cartridge(吸附作用)，然後再用 2mL 的甲醇萃取液，以每分鐘 4mL 的流速沖提 Sep-pak C₁₈ cartridge。甲醇部份的萃取液置於冰箱(0-5°C)幾個小時，如果有沉澱物可以再用小型過濾器(filter)去除之。濾液可直接用於 HPLC, CE 和 CEC 的分析。Sep-pak C₁₈ cartridge 在使用前，先用 10mL 的蒸餾水沖洗過，再用 5mL 的甲醇沖流，最後再用 10mL 蒸餾水沖洗。

(二)使用高效率液體層析法(HPLC)分析樣品

1.GINSANA-G115 人參藥品之分析：

圖一(A)是使用傳統有機溶劑萃取，圖一(B)是使用 Sep-pak C₁₈ 萃取所得的層析圖。比較(A)和(B)二層析圖，使用 Sep-pak C₁₈ cartridge 萃取所得的人參有效成份較為乾淨，且快速，而使用有機溶劑萃取過程中所耗時間過長，HPLC 的分析條件如下：使用 Bondapak C₁₈ 分離管柱 (30cm × 4.6mm) (Waters Associates)，流動相組成為 29%CH₃CN 和 71%H₂O(V/V)，流速 2mL/min，UV 偵測波長是使用 203nm。圖二(A)則改用 HPLC 分離管柱來分離使用 Sep-pak C₁₈ cartridge 萃取人參藥丸所得的層析圖。分析條件：使用 TSKgel ODS-120T 分離管柱(25cm×4.6mm I.D.)(Toyo Soda)，流動相組成為 27% CH₃CN 和 73% H₂O(V/V)，流速 1mL/min。圖二(B)則使用相同條件來分析 GINSANA-G115 人參藥丸的新產品。比較(A)和(B)二層析圖，新產品的 GINSANA-G115 人參藥丸，部份有效成份已沒有了，這可能原人參藥材已不同。

2.靈芝實體之分析：

圖三所示是我們分析日本靈芝(Mori Reishi)所得到的 HPLC 層析圖。A 圖代表使用傳統有機溶劑萃取法，而 B 圖是使用 Sep-pak C₁₈ 萃取所得的層析圖。其中波峰 1,2,3,4 分別代表 ganoderic acid A,B,C,D。分析條件如下：使用 TSKgel ODS-120 T 管柱，(25cm × 4.6mm I.D.)(Toyo Soda)，流動相組成為 2% AcOH-CH₃CN(2:1, V/V)，流速 0.9mL/min，UV 偵測波長 252nm。圖四則是使用 Sep-pak C₁₈ 萃取台灣生長的靈芝所得層析圖，波峰 1,2,3,4 所代表的 ganoderic acid 成份與圖三相同。

(三)使用毛細管電泳法(Capillary electrophoresis, 簡稱 CE)的分析方法

1.GINSANA-115 人參藥品之分析：

圖五(A)和(B)分別為使用 CZE(Capillary zone electrophoresis)和 MEKC(Micellar electrokinetic chromatography)來分析 G115 人參藥丸的圖譜。CZE 的分析管柱為 62cm，內徑 75μm(有效柱長 47.5cm)的 fused

毛細空管柱，偵測波長 203nm，分離電壓，20kV(421 Vcm⁻¹)。所用的 buffer 是 20mM sodium tetraborate 並用 20mM boric acid 調整 pH 值至 9。Buffer 使用之前先用 0.45μm filter 過濾。樣品注射是使用 electrokinetic 注射法(5kV，2 秒鐘)。微胞電動層析法(MEKC)所用的 buffer 是以上的溶液並加 50mM 的 SDS(sodium dodecyl sulfate)。比較圖五(A)和(B)，顯然使用 MEKC 的分離較 CZE 好。圖(B)的波峰主要分為二群，波峰 1,2,3,4 為一群，另一群為有部份重疊的波峰 5,6,7。圖六則為使用 MEKC 的分離法來分析人參藥丸的產品(new type)，所用的 buffer 和前面相同，新產品的有效成份顯然比較少，這和 HPLC 的分析結果相符合。比較 HPLC 和 MEKC 的分析結果，我們斷定圖五(B)的層析圖中，波峰 1,2,3 和 4 應屬人參的 20(S)-protopanaxadiol 結構，而波峰 5,6,7 則屬於 20(S)-protopanaxatriol。

2.靈芝實體之分析：

圖七(A)和(B)分別為使用 CZE 和 MEKC 來分析台灣生長的靈芝的圖譜。CZE 和 MEKC 的分析條件，除了偵測波長改為 252nm 外，其他相同，比較(A)和(B)圖分析結果很相近，但分離效果應屬圖(B)較好，即微胞電動層析法(MEKC)的分離效率較好。

四、成果自評

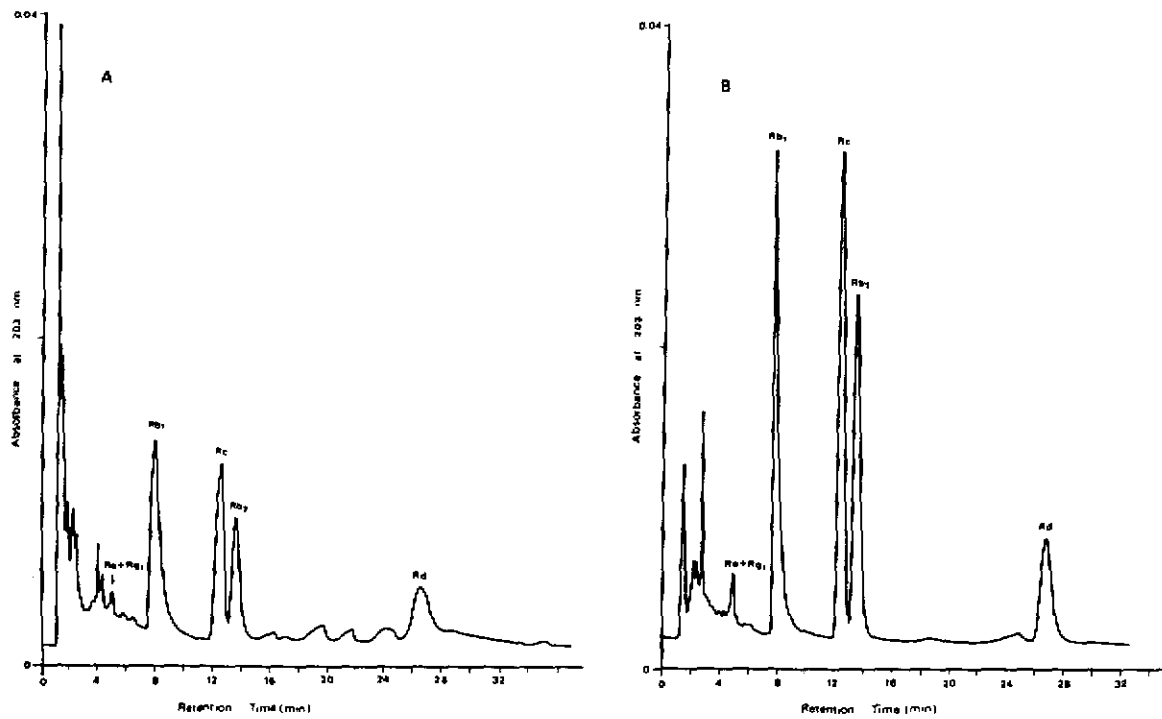
本研究計畫建立起一套快速有效萃取和分離人參、靈芝的方法，使用 Sep-Pak C₁₈ 固態萃取法比傳統有機溶劑萃取法來得快且有效，亦可做微量分析。而高效率液體層析法(HPLC)除了對有效成份做分離，鑑定外，亦可從樣品的 profile 分析，做品種鑑定。另外，CE，MEKC 和 CEC 為比較新的分離技術，在本研究裡，使用 CE 和 MEKC 來分析人參和靈芝有比較好的結果，但使用毛細管電動層析法(CEC)分析，結果較不理想。

五、參考文獻

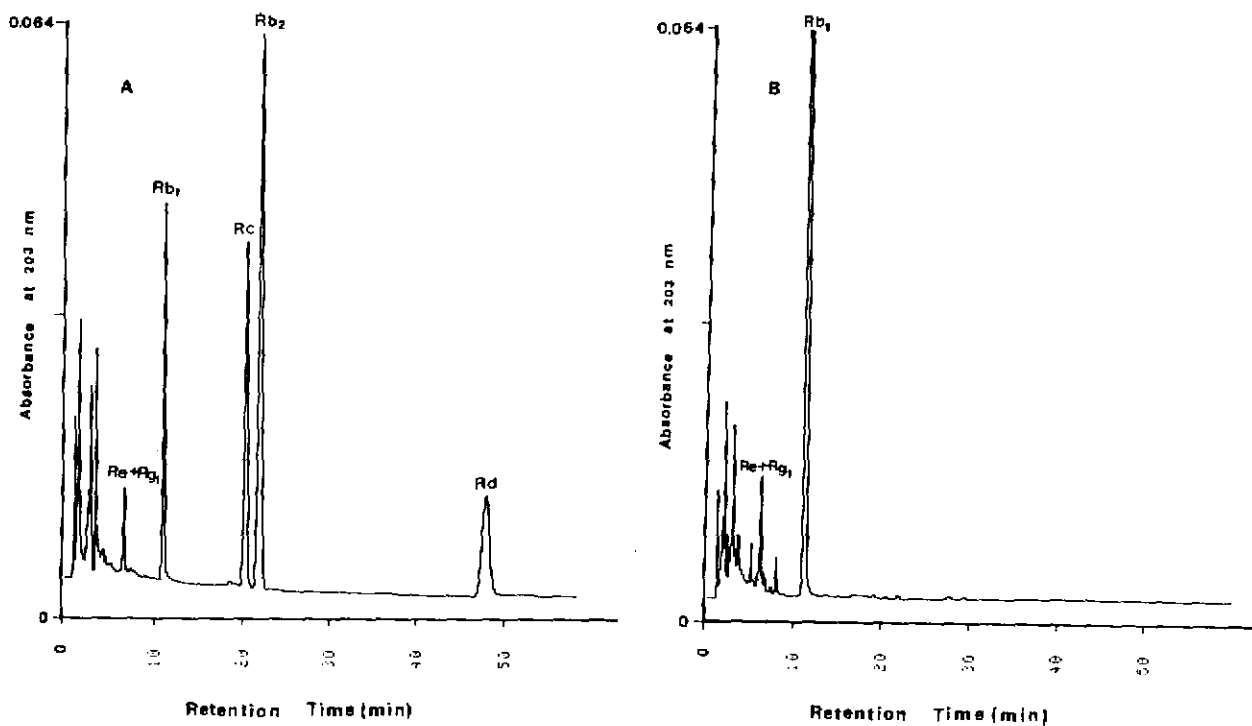
1.Kohda, H.; Tokumoto, W.; Sakamoto, K.;

- Fujii, M.; Hirai, Y.; Yamaski, K.; Komoda, Y.; Nakamura, H.; Ishihara, S.; Uchida, M. *Chem. Pharm. Bull.* 1985, 33, 1367.
2. Busse, H. J.; Banna, T. E.; Auling, G. *Appl. Env. Microbiol.* 1989, 55(6), 1578.
3. F. Sodati and O. Steher, *Planta Med.*, 1984, 39, 348.
4. E. Bombadelli, A. Bonati, B. Gabetta and E. M. Martineli; *J. of chromatogr.*, 1980, 196, 121-132.
5. M. Vanhaelen and R. Vanhaelen-Fastre, *J. of chromatogr.*, 1984, 312, 497-503.
6. W. F. Sye, *J. Chin. Chem., Soc.*, 1991, 38, 179-182.
7. W. F. Sye and P. F. Tsai, *J. Chin. Chem. Soc.*, 1987, 34, 1-6.
8. C. Y. Chu and S. J. Sheu, *J. of Chromatogr. A*, 1996, 756, 137-144.
9. M. C. Lee, W. C. Chuang, S. J. Sheu, *J. of Chromatogr. A*, 1996, 755, 113-119.
10. C. Horv'ath, G. Choudhary, X. Huang, *Proceeding of Nineteenth Internal Sym. On Capillary Chromatogr. And Electrophoresis*. P60, 1997.
11. Y. Chao; D. Rajeev; Z. Richard N; A. Deon, R. David, *Proceeding of Nineteenth Internal Sym. On Capillary Chromatogr. And Electrophoresis*, P86, 1997.
12. W. Demarest, K. M. Payne, K. R. Sedo, L. Y. Kwok, and T. Catalano, *Proceeding of Nineteenth Internal Sym. On Capillary Chromatogr. And Electrophoresis*, P88, 1997.

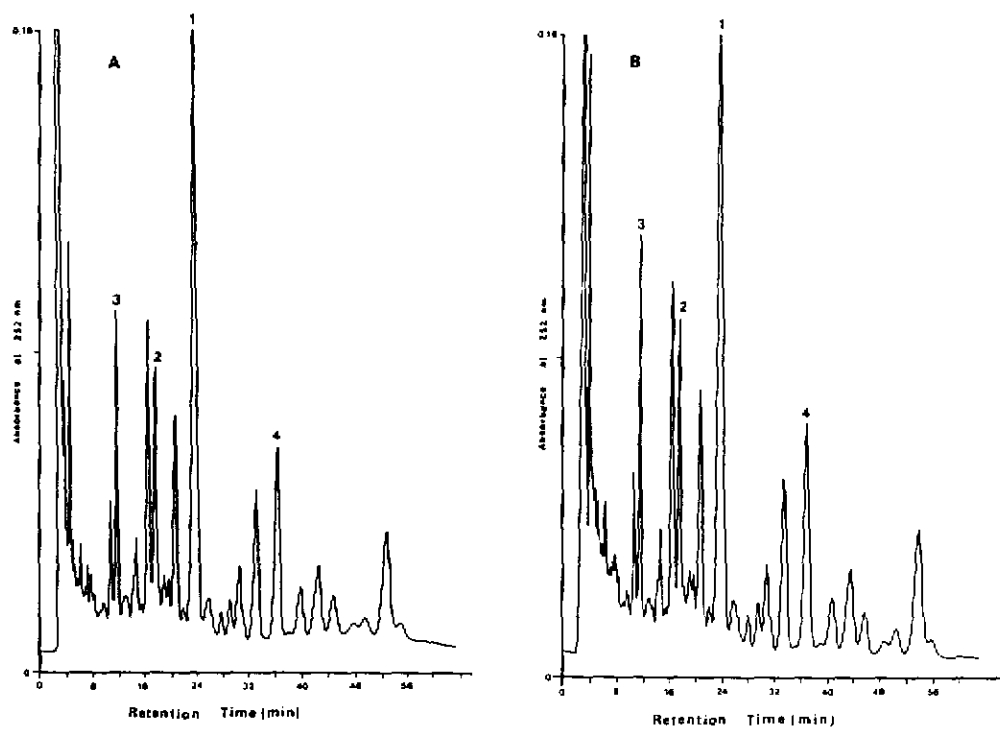
六、圖



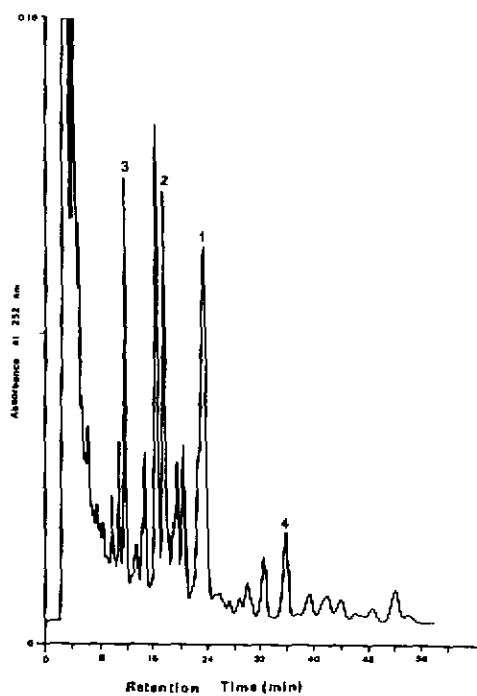
圖一.GINSANA-G115 人參藥品之 HPLC 分析圖：(A)使用傳統有機溶劑萃取法；(B)使用 Sep-Pak C18 cartridge 萃取法



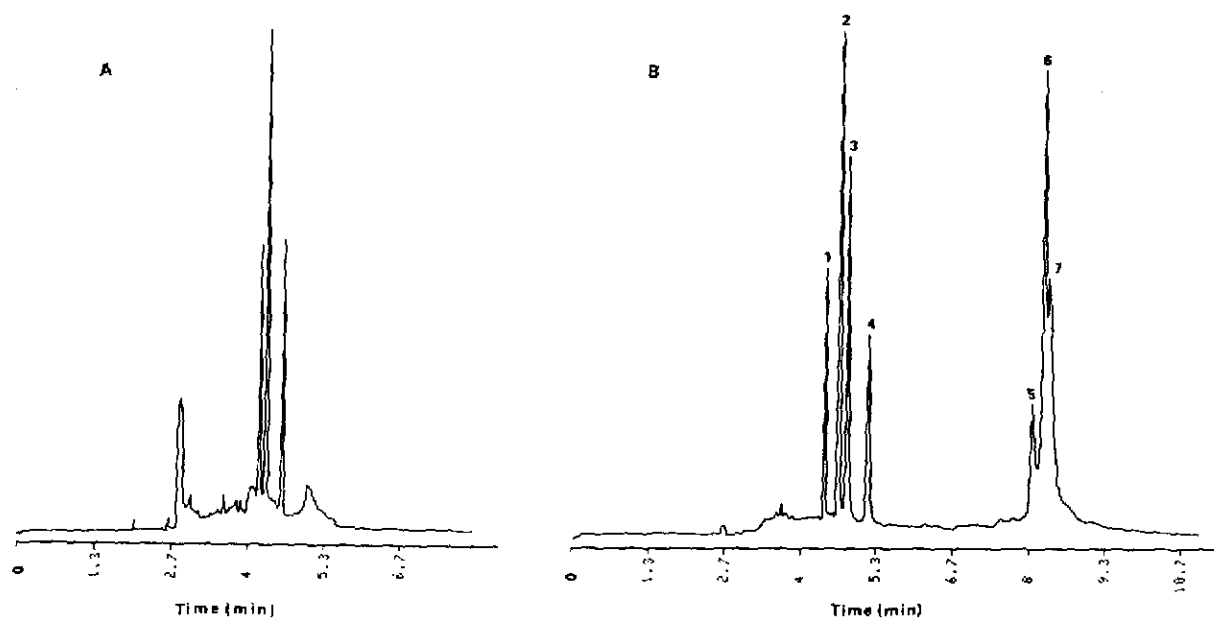
圖二.GINSANA-G115 人參藥品之 HPLC 分析圖(使用 TSKgel ODS-120T 管柱)：(A) GINSANA-G115 舊產品；(B) GINSANA-G115 新產品



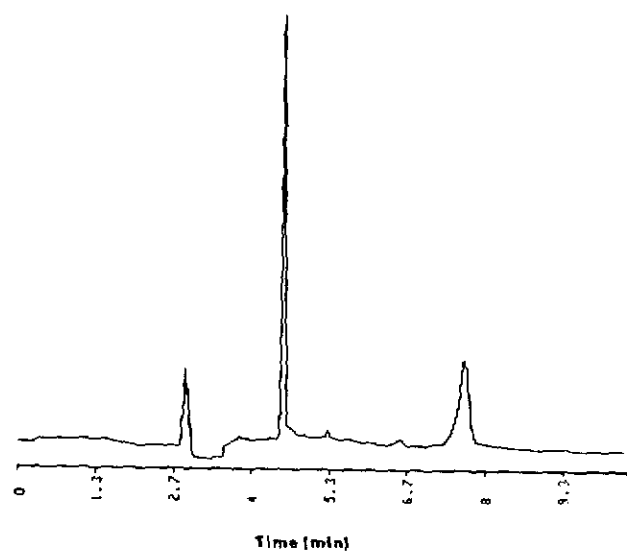
圖三.日本靈芝(Mori Reishi)之 HPLC 分析圖：(A)傳統有機溶劑萃取法；(B)使用 Sep-Pak C₁₈ cartridge 萃取法



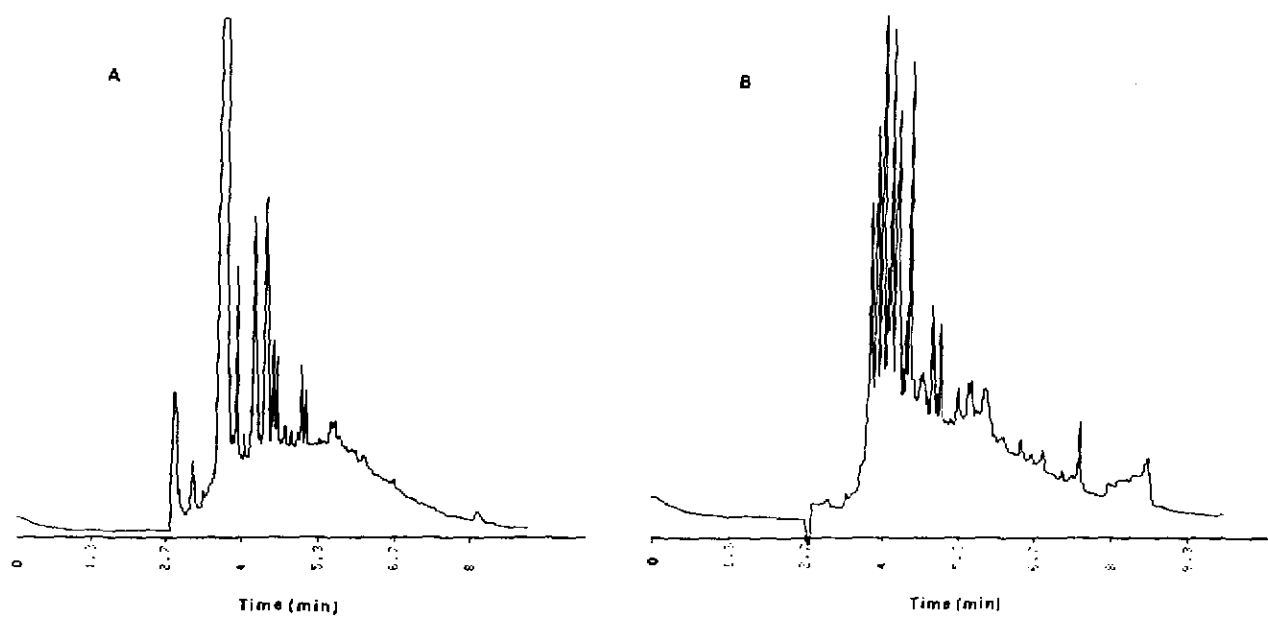
圖四.台灣靈芝使用 Sep-Pak C₁₈ cartridge 萃取的 HPLC 分析圖



圖五. GINSANA-G115 人參藥品之 CE 分析圖：(A)使用 CZE 方法；(B)使用 MEKC 方法



圖六. GINSANA-G115 人參藥品新產品使用 MEKC 分析之層析圖



圖七.台灣靈芝之 CE 分析圖：(A)使用 CZE 方法；(B)使用 MEKC 方法